

主論文の要旨

**Pathogenesis of a variant in the 5' untranslated region
of *ADAR1* in dyschromatosis symmetrica hereditaria**

〔 遺伝性対側性色素異常症における、原因遺伝子 *ADAR1* の
5'UTR 領域バリエントの病原性 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 皮膚病態学分野

(指導：秋山 真志 教授)

菅沼 睦美

【緒言】

遺伝性対側性色素異常症(DSH)は、四肢末端に色素斑および脱色素斑が混じた臨床像を示す。常染色体優性遺伝形式を示し、原因遺伝子は *ADARI* であり、幼少期に発症する。本研究では、臨床症状が典型でありながら *ADARI* のコード領域およびエクソン隣接領域に遺伝子変異を認めず、5'UTR (untranslated region) 内のバリエント c.-60A>G のみをヘテロ接合性に持つ1症例について、このバリエントが本疾患を発症させる病的な変異であるかどうかを検討した。

【材料と方法】

本症例は、患者とその母親に DSH の典型的な臨床像があり、父親には、臨床像を認めない。ダイレクトシーケンス法にて本症例の家族の *ADARI* 変異解析を行い変異の有無を確認した。日本人正常コントロール 100 人の本バリエントの有無も同法で確認した。*ADARI* のスプライシング変異や large insertions/deletions の有無も確認した。

ADARI の 5'UTR 上に認めたバリエント c.-60A>G の機能解析をする為、患者血液から RNA を抽出し、*ADARI* の 5'UTR 領域の野生型と変異型をそれぞれクローニングした。その配列をプロモーターとルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入したレポーター遺伝子を作成し、色素細胞とメラノーマ細胞を使用してルシフェラーゼアッセイを行った。

また、このバリエントが転写レベルと翻訳レベルのいずれに影響しているのかを検討するため、同様にリアルタイム PCR、ポリゾーマル解析と2次構造予測解析 (*in silico*) を行った。ポリゾーマル解析では、ポリゾームの分画とモノソームの分画をそれぞれ回収して、そこに含まれている野生型と変異型の mRNA の量を測定し、翻訳効率の確認を行った。

このバリエントが翻訳に影響した機序を明らかにするため、このバリエントの有無による 5'UTR の mRNA の二次構造の違いを UNAFold、Two-state Folding にて解析した。

さらに *ADARI* の 5'UTR の機能について検討するため、5'UTR 部分を4分割し、それぞれ1つずつ欠損させた4つのレポーターを作成し、ルシフェラーゼアッセイにて5'UTR のそれぞれの部位の遺伝子発現への影響を検討した。5'UTR の長さは 192bp あり、ATG 側から 48bp ずつ A, B, C, D とし、それぞれ欠損させた。この B 領域(48bp)において、さらに細かく4分割し(B-1, B-2, B-3, B-4、各 12bp)、同様に遺伝子発現への影響を確認した。

【結果】

ダイレクトシーケンスにて患者とその母親において、*ADARI* の 5'UTR 領域のバリエント c.-60A>G のみを認めた。日本人正常コントロール 100 人にこのバリエントは認めなかった。*ADARI* のスプライシング変異や large insertions/deletions の確認も行ったが変異は認めなかった。ルシフェラーゼアッセイにより 5'UTR 上のバリエント c.-60A>G の野生型と変異型の発現を比較した結果、バリエントの発現は正常と比較して 43%減少 ($p<0.05$) していた。転写解析のリアルタイム PCR でルシフェラーゼの

mRNA 量を定量した結果では、変異型の mRNA 量は 16%の減少で、野生型と有意差を認めなかった ($p>0.05$)。翻訳解析のポリソーマル解析において、ポリゾームでの mRNA の量を比較したところ、変異型の発現は野生型と比較して 51%減少 ($p<0.05$) した。モノソームでの mRNA の量には、野生型と変異型とで有意な差は認めなかった (Figure 1)。二次構造予測解析ソフトでは、バリエントの配列において 2 次構造が大きく変化した (Figure 2)。

ADARI の 5'UTR の機能解析では、A 領域を欠損させた遺伝子の発現は、76%に減少 ($p<0.005$) した。B 領域を欠損させた遺伝子の発現は、216% ($p<0.0005$) に増加した。しかし、C と D 領域を欠損させた遺伝子の発現には、変化を認めなかった。

B 領域をさらに分割した解析結果では、B-1 と B-2 をそれぞれ欠損させた遺伝子の発現は 60% ($p<0.0005$) と 69% ($p<0.05$) に減少し、B-3 と B-4 をそれぞれ欠損させた遺伝子の発現は、135% ($p<0.05$) と 127% ($p<0.05$) に増加した。

【考察】

ADARI 5'UTR 上のバリエント c.-60A>G のルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析では、変異型の遺伝子発現が 43%減少していた。DSH は、*ADARI* の haploinsufficiency により発症することが知られているが、RNA エディティングアッセイで、DSH 患者の RNA 編集効率は正常人の 86.9%であるとの報告もあり、本症例での比較的軽度の遺伝子発現減少でも病因となり得る。

DSH の病因となることが証明された *ADARI* の 5'UTR 上の変異の報告は世界初である。5'UTR 上の変異による発症する遺伝性疾患には 2 つの病態がある。1 つは、5'UTR の変異により新たな ATG が作られ、そこから翻訳が開始されることで通常より長い読み枠になることや読み枠がずれ、未熟なタンパク質が作られることが病因となるパターンである。このパターンの病態は、遺伝性出血性末梢血管拡張症 (hereditary hemorrhagic telangiectasia; HHT) と頭蓋前頭鼻骨症候群 (craniofrontonasal syndrome; CFNS) などで報告されている。本症例の配列も検討したが、今回のバリエントが新たな ATG を誘導する変異でないこと、また、翻訳開始予測サイトである NetStart では大きな違いはみられなかったことから、このパターンの病態は否定された。もう 1 つは 5'UTR の変異による二次構造の違いが病因となるパターンである。このパターンの病態は、レーバー先天黒内障 (Leber congenital amaurosis; LCA) で報告されている。本症例の 5'UTR の野生型と今回のバリエントの二次構造にも明らかな違いが見られた。

真核生物の翻訳開始においては、AUG 周囲の Kozak 配列と AUG の前後の二次構造が重要であり、AUG より上流の二次構造がリボゾーム結合やスキヤニングの抑制に影響し、翻訳効率を決めると報告されている。本症例のバリエントでも、5'UTR の二次構造を変化させることが *in silico* で予想され、実際に翻訳を抑制することを *in vitro* の実験で証明した。さらに、*ADARI* の 5'UTR の機能解析により、部位によって発現上昇および低下することを明らかにした。以上より、本症例では 5'UTR の変異による二次構造の違いが病因となっていると考えられる。

【結語】

ADARI の 5'UTR のバリエント c.-60A>G は、5'UTR の二次構造を変化させることにより、翻訳機能を低下させ、これによって *ADARI* の発現低下を生じ、DSH の発症に関与することを明らかにした。また、*ADARI* の 5'UTR の機能解析では、B 領域(c.-49~c.-96)が、*ADARI* の発現に重要な領域であることが示唆された。